

**Untersuchungen zum Vorkommen
von koagulasepositiven Staphylokokken
bei laktierenden Kühen**

Sepp Thüring

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. G. Terplan

Untersuchungen zum Vorkommen von koagulasepositiven
Staphylokokken bei laktierenden Kühen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Sepp Thüring
aus
Pfarrkirchen

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E Dahme

Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Gedek

Korreferent: Prof. Dr. K. Walser

Tag der Promotion: 26. Juli 1974



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	2
A. Taxonomie der gram- und katalasepositiven Kokken	2
B. Isolierung von Staphylokokken	5
C. Vorkommen von Staph. aureus auf der Euterhaut und an anderen Körperstellen beim Rind	8
D. Strichkanal- und intramammäre Infektionen beim Rind	11
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	13
A. Material	13
B. Methodik	14
1. Entnahme, bakteriologische Untersuchung und indirekte Zellgehaltsbestimmung von Viertelgemelksproben	14
2. Entnahme und bakteriologische Untersuchungen von Tupferproben der Zitzen- und Euterhaut	14
3. Entnahme und bakteriologische Untersuchung von Abstrichen aus dem Strichkanal	17
C. Versuche und Versuchsergebnisse	18
1. Untersuchungen zum Vorkommen von Staph. aureus auf der Euterhaut in Milchvieherde ohne Nach- weis von Staph. aureus in der Milch	18
a) Kulturelle Untersuchung mittels Mannitol Salt Agar	
b) Kulturelle Untersuchung mittels selektiven Blutagar	
c) Selektive Anreicherung	
2. Untersuchungen zum Vorkommen von Staph. aureus im Strichkanal und auf der Euterhaut bei gleich- zeitigem Nachweis von Staph. aureus in der Milch einzelner Kühe in der Herde	24
IV. DISKUSSION	28
V. ZUSAMMENFASSUNG	32
VI. SUMMARY	33
VII. LITERATURVERZEICHNIS	34

1. Einleitung

Koagulasepositive Staphylokokken sind in allen Ländern mit intensiver Milchviehhaltung als Erreger von Mastitiden des Rindes weit verbreitet. In aseptisch entnommenen Milchproben werden sie oft in großer Anzahl nachgewiesen. Auch außerhalb des Euters werden diese Keime mitunter nachgewiesen, ein Befund, der einfach zu interpretieren ist, wenn in der betreffenden Herde Kühe mit Staphylococcus (Staph.) aureus-Euterinfektionen stehen, die man sich als Keimreservoir vorstellen kann. Einzelne Untersucher konnten koagulasepositive Staphylokokken beim Rind - abgesehen von der Milch - nicht finden. In vielen Fällen fehlte aber der Bezug zum Vorkommen von Staph. aureus-Euterinfektionen in der Herde. Umfangreiche, systematische Untersuchungen über das Vorkommen dieser Keime an der Euter- und Zitzenhaut bei Kühen aus Herden, die aufgrund wiederholter Untersuchungen als frei von Staph. aureus-Euterinfektionen anzusehen sind, stehen aus.

Meine Aufgabe war es, in einer größeren Anzahl von Rinderherden, in denen Staph. aureus-Euterinfektionen nicht nachgewiesen werden konnten, die Verbreitung von Staph. aureus auf der Euter- und Zitzenhaut zu prüfen. Milchhygienisch ist diese Frage im Zusammenhang mit dem Staphylokokkengehalt der Rohmilch und dessen Beurteilung von Interesse. Die Untersuchungen sollten einen Beitrag zu der wichtigen Frage leisten, ob Staph. aureus als ubiquitärer Keim beim Rind bewertet werden kann. Des weiteren sollten die quantitativen Beziehungen zwischen dem Vorkommen von Staph. aureus im Strichkanal, in Viertelgemelkproben (Anfangs- und Endgemelk) und auf der Euterhaut geprüft werden.

II. LITERATUR

A. Taxonomie der gram- und katalasepositiven Kokken

1. Allgemeines

Nach dem heute von vielen Bakteriologen bevorzugten Klassifikationsschema der Bakterien, dem 1957 von BREED et al. herausgegebenen Standardwerk "Bergey's manual of determinative bacteriology", werden die gram- und katalasepositiven Haufenkokken in die Familie Micrococcaceae eingeordnet. Innerhalb dieser Familie interessieren die beiden Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* in besonderer Weise, da sie nicht selten in Kuhmilch auf der Euterhaut und an anderen Körperstellen beim Rind gefunden werden. Das Genus *Staphylococcus* gliedert sich in die beiden Spezies *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis*. *Staph. aureus* ist in der Lage, Blutplasma von Mensch oder Kaninchen zu koagulieren und Mannit unter anaeroben Bedingungen zu spalten. Im Gegensatz dazu verfügt *Staph. epidermidis* über diese beiden Eigenschaften nicht. Gemeinsam ist beiden Spezies jedoch das Vermögen, Glucose anaerob unter Säurebildung zu spalten, und das fakultativ anaerobe Wachstum. In ihrer Morphologie-Bildung von unregelmäßigen Haufen, gelegentlich einzeln, in Diplo- oder Tetraederform liegend - sind beide Spezies nicht zu unterscheiden. Auch gegenüber dem Genus *Micrococcus* können sie morphologisch nicht unterschieden werden. Gegenüber dem Genus *Micrococcus* ist ein wesentlicher Unterschied dadurch gegeben, daß das Genus *Micrococcus* Glucose nicht oder lediglich oxidativ verwertet und nur unter aeroben Bedingungen wächst.

Während also Morphologie, Gramfärbung und Katalasebildung als gemeinsame Merkmale einzustufen sind, müssen Koagulasebildung sowie anaerobe Glucose- und Mannitspaltung als wichtige Unterscheidungskriterien zwischen den Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* einerseits und den Spezies *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* andererseits angesehen werden. Deshalb wurden auch vom Subcommittee on Taxonomy of *Staphylococci*

and Micrococci (1965) Empfehlungen zur Durchführung und Bewertung dieser drei taxonomisch so wichtigen Tests gegeben, um eine einheitliche Klassifikation dieser Keime zu ermöglichen.

Nomenklatur und Klassifikation der gram- und katalasepositiven Kokken sind umstritten, und es gibt verschiedene Klassifikationssysteme (SHAW et al., 1951; HILL 1959; BAIRD-PARKER, 1963). Die Koagulasereaktion wird jedoch allgemein als sehr wichtiges taxonomisches Kriterium anerkannt.

2. Koagulasereaktion

Nach den Empfehlungen des Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci (1965) wird die Koagulasereaktion durch Einimpfen der zu prüfenden Kultur in Kaninchen-Zitratplasma im Röhrchen und anschließender Bebrütung geprüft, wobei jeder Grad der Gerinnung als positiv zu bewerten ist. Diese in der Routinediagnostik aufwendige Methode kann in einem großen Teil der Fälle durch Prüfung der β -Hämolysinbildung (hot-cold-lysis) auf geeignetem Blutagar ersetzt werden. Nach SCHALM und WOODS (1953) und GEDEK (1966) besteht zwischen der Bildung der β -Hämolysinzone auf Rinderblutagar und dem positiven Ausfall der Koagulasereaktion eine sehr enge Korrelation, so daß man in der Routinediagnostik den β -hämolysinbildenden Staphylokokkenstamm als koagulasepositiv ansehen kann, wobei es gleichgültig ist, ob nur β -Hämolysin oder neben β -Hämolysin auch noch andere Hämolysine gebildet werden. Wird β -Hämolysin jedoch nicht gebildet, kann der betreffende Staphylokokkenstamm durchaus koagulasepositiv sein.

3. Plasmaagglutination

In der Routinediagnostik kann zur Erkennung koagulasepositiver Stämme, soweit keine β -Hämolysinbildung beobachtet wird, die Plasmaagglutination herangezogen werden (GRÜN, 1961).

Diese Reaktion besteht darin, daß beim Einreiben der Bakterien in das Plasma sofort oder innerhalb von 10 Sekunden eine grobe, unregelmäßige Verklumpung eintritt. Zur Auffindung koagulasepositiver Stämme im Routineverfahren wird die technisch einfache und schnell durchführbare Plasmaagglutination empfohlen, da sie bei koagulasenegativen Staphylokokkenstämmen nicht oder nur höchst selten zu falsch positiven Ergebnissen führt und da sie zu einem hohen Prozentsatz (88-99%) koagulasepositive Stämme erfaßt (GRÜN, 1961).

Bei Rinder-Staphylokokken fand GEDEK (1966) unter anhämolysischen sowie schwachhämolysischen Stämmen eine ausgezeichnete Übereinstimmung der Ergebnisse von Koagulasereaktion und Plasmaagglutination, während bei starkhämolysischen Stämmen (ohne β -Hämolysinbildung), die allerdings seltener vorkommen, größere Abweichungen beobachtet wurden.

B. Isolierung von Staphylokokken

Staphylokokken wachsen auf gewöhnlichen Agarnährböden unter aeroben Bedingungen üppig und in kurzer Zeit (GRÜN, 1964). Ihre Kultivierung stellt keine besonderen Ansprüche. Schwierigkeiten entstehen jedoch bei der Herauszüchtung dieser Keime aus bakteriell stärker kontaminiertem Material. Schon die Vielzahl der heute zur Isolierung von Staphylokokken verwendeten Selektivmedien zeigt, daß es einen allen Anforderungen entsprechenden Selektivnährboden nicht gibt. Von besonderem Interesse erscheinen aufgrund von Praktikabilität und Leistungsfähigkeit die im folgenden beschriebenen Selektivnährmedien.

1. Mannitol Salt Agar

Dieses Selektivmedium enthält das rechtsdrehende Mannit, einen zuckerartigen, sechswertigen Alkohol, der von einem Teil der Staphylokokken enzymatisch dehydriert wird, wobei Säure entsteht, die man mit einem Indikator, in diesem Falle Phenolrot, nachweisen kann. Dieser Selektivnährboden enthält außerdem Kochsalz in einer Konzentration von 7,5%. Diese Kochsalzkonzentration unterdrückt das Wachstum von Begleitbakterien, insbesondere von gramnegativen Stäbchen, während die Staphylokokken wachsen können. Eine gelbliche Verfärbung aufgrund der Säurebildung unter und um den Kolonien zeigt die mannitpositiven Stämme an. Die mannitpositiven Stämme sind weiter durch üppiges Wachstum und gleichmäßig kräftige Pigmentierung charakterisiert, während mannitnegative Stämme schwächer und meist pigmentlos auf dem unveränderten, rötlichen Agaruntergrund wachsen (GRÜN, 1964). 89,1 - 100% der koagulasepositiven Staphylokokken spalten Mannit anaerob. Bei koagulasenegativen Stämmen wurden große Unterschiede in der Fähigkeit der anaeroben Mannitspaltung beobachtet. Die anaerobe Fermentierung von Mannit soll dagegen nur koagulasepositiven Stämmen gelingen (EVANS, 1948). Unter 11 auf ihre Leistungsfähigkeit getesteten Staph. aureus-Selektivmedien wurde

Mannitol Salt Agar neben drei anderen Nährböden als besonders geeignet herausgestellt. Die 11 Selektivmedien waren bei der Untersuchung von Lebensmitteln vergleichend geprüft worden (PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE WORKING PARTY, 1972).

2. Selektivmedium nach CULLEN und HEBERT (1967)

Für die Untersuchung der Bakterienflora von Zitzenhaut und Strichkanal sowie Milchproben vom Rind verwendeten CULLEN und HEBERT einen Blutagar, der aus Nähragar mit 5% defibriertem Schafblut, 0,1% Aeskulin und Amphotericin B (10 mcg/ml) sowie Actidion (1 : 10.000) bestand. Amphotericin B und Actidion sind Fungistatika, die das Wachstum der an der Zitzenhaut oder im Strichkanal befindlichen Hefen und Pilze hemmen sollen, da diese Mikroorganismen auf Blutagar ebenfalls wachsen und die Entwicklung und Auffindung von Bakterienkolonien behindern können. Mit diesem Selektivmedium konnten CULLEN und HEBERT zufriedenstellende Ergebnisse erzielen. Als Vorteil erwies sich, daß anhand der Ausbildung der β -Hämolysinzonen koagulasepositive Stämme gleich erkannt werden konnten.

3. Bebrütung von Milch mit Zusatz von Natriumazid

SLANETZ und BARTLEY (1953) bebrüteten aseptisch entnommene Milchproben bei 35°C für die Dauer von 18 Stunden und strichen 0,01 ml von jeder Probe auf Blutagar aus. Im Vergleich zum Direktausstrich frischer Milch auf Blutagar konnten sie damit die Ausbeute an Staph. aureus-Befunden bei der Untersuchung von 1.380 Milchproben um 27% erhöhen. Sie empfahlen zur Unterdrückung des Wachstums von Schmutzkeimen einen Zusatz von Natriumazid (NaN_3) zur Milch vor der Bebrütung im Verhältnis 1 : 20.000.

4. Selektives Anreicherungsverfahren nach HEESCHEN et al. (1968)

HEESCHEN et al. verwendeten zum Nachweis koagulasepositiver Staphylokokken in Milch ein selektives, flüssiges Anreicherungsmedium, das Sojapepton, Caseinpepton, Hefeextrakt, D-Mannit, Glykokoll, Dikaliumphosphat, Lithiumchlorid, Natriumpyruvat und Kaliumtellurit enthält. Als selektive Agentien wirken Lithiumchlorid und Glykokoll, während Natriumpyruvat stimulierende Wirkung auf das Wachstum von koagulasepositiven Staphylokokken hat.

BAIRD-PARKER (1962) hatte die gleichen Bestandteile bereits in einem festen Nährboden verwendet. Der Vorteil des flüssigen Anreicherungsmediums ist, daß man eine verhältnismäßig große Menge Milch, nämlich 0,1 ml, ansetzt. Pro Röhrchen werden 5 ml Selektivmedium abgefüllt. Die Bebrütung erfolgt für die Dauer von 20 - 22 Stunden. Koagulasepositive Staphylokokken können Kaliumtellurit zu metallischem Tellur reduzieren, wobei eine schwarze Verfärbung des Selektivmediums zustande kommt. Die Mehrausbeute an Staph. aureus-Befunden gegenüber dem Direktausstrich von 0,1 ml bei der Untersuchung von 4.904 Viertelgemelkproben betrug 39,6%. 3,3% von auf Blutagar nach Direktausstrich gewachsenen koagulasepositiven Staphylokokkenstämmen wurden durch die Anreicherung nicht erfaßt.

C. Vorkommen von *Staph. aureus* auf der Euterhaut und an anderen Körperstellen beim Rind

Es existiert eine Vielzahl von Beobachtungen, wonach *Staph. aureus* nicht nur in der Milch, sondern auch an der Euter- und Zitzenhaut, an verschiedenen Körperstellen des Rindes und in der Umgebung des Rindes nachgewiesen werden konnte.

Die Euter- und Zitzenhaut ist ein häufiger Fundort von koagulasepositiven Staphylokokken (MC DIARMID, 1947; SPENCER und LASMANIS, 1952; EDWARDS und RIPPON, 1957; THÖRNE und WALLMARK, 1960; DAVIDSON, 1961 a, b; CULLEN und HEBERT, 1967). Die Ergebnisse überraschen nicht, da in diesen Fällen koagulasepositive Staphylokokken auch aus Milchproben von Kühen der entsprechenden Versuchsherden isoliert werden konnten. Beim Melken gelangen dann diese Keime an die Euter- bzw. Zitzenhaut. An den Händen der Melker und an den Zitzenbechern der Melkmaschine konnten koagulasepositive Staphylokokken ebenfalls nachgewiesen werden (SPENCER und LASMANIS, 1952; EDWARDS und RIPPON, 1957; THÖRNE und WALLMARK, 1960). Keine Berichte liegen dagegen zu der Frage vor, ob *Staph. aureus* an der Euter- bzw. Zitzenhaut gefunden worden ist, wenn in der betreffenden Herde dieser Keim mit der Milch von einer oder mehreren Kühen nicht ausgeschieden wird.

Staph. aureus konnte, allerdings im geringeren Umfange, auch an anderen Körperstellen (z.B. Flotzmaul, Vagina, Anus, Brust, Sakralregion) nachgewiesen werden (SPENCER und LASMANIS, 1952; DAVIDSON, 1961 a, b).

Sehr umfangreiche Untersuchungen zur Epidemiologie der *Staph. aureus*-Mastitis wurden von DAVIDSON (1961 a, b) durchgeführt, der in einer Herde von 24 Kühen unter Zuhilfenahme der Lyso-
typie den Weg der *Staph. aureus*-Stämme über einen Zeitraum von sechs Jahren verfolgte.

DAVIDSON (1961 a) konnte nachweisen, daß *Staph. aureus* in einer infizierten Milchviehherde am häufigsten an der Euter- bzw. Zitzenhaut gefunden wird. Der Prozentsatz der positiven

Proben betrug hier 36,2 bzw. 38,0 (Tab. 1). Relativ häufig wurden diese Keime auch im Bereich der Sakralregion (29,9%), am Bauch (23,5%) und an der Brust (20,9%) gefunden.

Tabelle I

Nachweis von Staph. aureus in Tupferproben von einer Milchviehherde (nach DAVIDSON, 1961 a)

	Zitzen	Euter	Nase	Flotz- maul	Augen	Vagina	Rektum	Kopf	Brust	Sakral- region	Schwanz- falten	Bauch
Anzahl der Proben	11.632	5.893	935	965	920	918	879	932	961	940	927	888
Anzahl der po- sitiven Proben	4.423	2.132	45	61	15	97	46	105	201	281	96	209
Prozentsatz der positiven Proben	38,0	36,2	4,81	6,38	1,63	10,6	5,23	11,3	20,9	29,9	10,4	23,5

D. Strichkanal- und intramammäre Infektionen beim Rind

Subklinische Mastitiden sind schwierig zu diagnostizieren, da einmal physiologisch und pathologisch bedingter Zellgehalt in bestimmten Bereichen nicht exakt genug abzugrenzen sind und zum anderen die nach aseptischer Probenentnahme in der Milch nachgewiesenen Keime nicht unbedingt aus dem Euter stammen. Wegen des Vorkommens von Strichkanalinfektionen kann es dazu kommen, daß die durch Handmelken gewonnene Probe beim Durchströmen des Strichkanals mit dort befindlichen Keimen kontaminiert und auf diese Weise eine Euterinfektion vorgetäuscht wird. Um intramammäre Infektionen zu erkennen, muß die Milch aus der Zitzen- bzw. Drüsenzisterne mittels Spritze aseptisch entnommen werden. MURPHY und STUART (1954) beschrieben eine Methode zur Gewinnung von Milch aus der Zitzenzisterne durch Punktion. Infektionen oder Zellgehaltserhöhungen als Folge der Punktion wurden nicht beobachtet. Auch BEECH und FORBES (1965), FORBES und HEBERT (1968) sowie FORBES (1970 a) bedienten sich für epidemiologische Untersuchungen dieser Methode. HEIDRICH et al. (1964 a, b) punktierten die Drüsenzisterne mit Venülen (Behringwerke; ohne Zitrat), um intramammäre Infektionen zu erkennen. Nach der Punktion von Zitzen- bzw. Drüsenzisterne wird im allgemeinen ein Strichkanal-Abstrich gemacht und anschließend eine Milchprobe durch Handmelken entnommen, um Strichkanal- und Milchkontaminationen zu unterscheiden. Nach SHARPE et al. (1962) können koagulasepositive Staphylokokken in Strichkanälen für mehrere Monate persistieren, ohne daß intramammäre Infektionen entstehen. BEECH und FORBES (1965) stellten fest, daß Strichkanalinfektionen bis zu 18 Wochen bestehen bleiben können, wobei ein Teil der Infektionen spontan verschwindet, ein anderer Teil zu intramammären Infektionen führt. Der Strichkanal kann verschiedene euterpathogene Keime beherbergen, und es können gelegentlich im Euter andere Keime nachgewiesen werden wie im Strichkanal.

FORBES und HEBERT (1968) ermittelten nach längeren Untersuchungen in einer Herde von 28 Kühen, daß dort bei intramammä-

ren Staph. aureus- und Staph. epidermidis-Infektionen in der Mehrzahl der Fälle vorher Strichkanalinfektionen beobachtet worden waren. Reine Strichkanalinfektionen hatten kein Ansteigen des Zellgehalts zur Folge. Ein Ansteigen des Zellgehalts wurde erst bei intramammären Infektionen beobachtet. Es konnte auch festgestellt werden, daß intramammäre Infektionen durch Infektionen des Strichkanals unterhalten wurden.

Nach den Untersuchungen von FORBES (1968) scheinen im Strichkanal ansässige Bakterien im Verlaufe des ordnungsgemäßen Melkens mit einer intakten Melkmaschine sehr selten in die Zitzenzisterne eingebracht zu werden. Dem gesunden Strichkanal kommt die Funktion einer Barriere gegen von außen eindringende Mastitiserreger zu (FORBES, 1969).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material

Für den ersten Teil der Untersuchungen wurden 30 Milchviehherden aus verschiedenen Gegenden Oberbayerns ausgewählt. In der Milch von allen laktierenden Kühen aus diesen Herden konnten im Rahmen der Untersuchungen des Eutergesundheitsdienstes koagulasepositive Staphylokokken durch das kulturelle Nachweisverfahren nicht nachgewiesen werden. Als Nährmedium war Tryptose Blood Agar Base (Difco), der zu 7% dreimal gewaschene Rindererythrozyten enthielt, verwendet worden. Die Entnahme der Milchproben erfolgte nach der Methode von DIERNHOFER (1950). Jeweils 0,01 ml von Viertelgemelkproben (Anfangsgemelk) waren auf einem Viertel einer Blutplatte mittels normierter Ösen ausgestrichen worden. In den 30 Versuchsherden standen 169 Kühe.

Der zweite Teil der Untersuchungen umfaßte Tests in einer Herde mit 63 Kühen, in der regelmäßig *Staphylococcus aureus*-Euterinfektionen beobachtet wurden.

B. Methodik

1. Entnahme, bakteriologische Untersuchung und indirekte Zellgehaltsbestimmung von Viertelgemelkproben

Die Entnahme der Viertelgemelkproben erfolgte nach der Methode von DIERNHOFER (1950).

Die Zitzenkuppe wurde mit 70%igem vergällten Alkohol desinfiziert. Danach erfolgte das Abmelken der ersten Milchstrahlen. Pro Euterviertel wurden danach etwa 5 ml Milch in ein steriles Röhrchen gemolken. Die so gewonnenen Proben wurden sofort gekühlt und innerhalb von vier Stunden verarbeitet.

Mit einer normierten Öse wurden 0,01 ml Milch von jeder Probe nach gutem Durchmischen auf je ein Viertel einer Blutagarplatte ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C für die Dauer von 36 bis 48 Stunden. Der Blutagar bestand aus Blood Agar Base (Oxoid) und zu 7% aus gewaschenen Rindererythrozyten.

Die indirekte Zellgehaltsbestimmung wurde nach der Methode von SCHALM und NOORLANDER (1957) durchgeführt. Dabei wurden 1 bis 2 ml Milch pro Viertel mit der gleichen Menge Testflüssigkeit unter kreisenden Bewegungen in der Testschale vermischt. Die Beurteilung erfolgte nach dem Schema von SCHALM (1960).

2. Entnahme und bakteriologische Untersuchung von Tupferproben der Zitzen- und Euterhaut

Zur Untersuchung der Euterhaut auf das Vorkommen von Staph. aureus wurden Tupferabstriche von der Zitzenkuppe, der Zitzenhaut und der Euterhaut gemacht.

Die sterilen Wattetupfer wurden trocken in sterilen Reagenzgläsern aufbewahrt. Nach der Entnahme von Tupferproben wurde wie folgt verfahren:

- a) Bei 11 Rinderherden mit 62 Kühen wurden die Wattetupfer sofort nach dem Abstrich in Reagenzgläser, die jeweils mit 5 ml steriler Bouillon (Nutrient Broth, Oxoid) gefüllt waren, verbracht. Nach sofortiger Kühlung wurde mit der bakteriologischen Untersuchung innerhalb von 5 Stunden begonnen.

Die Proben wurden intensiv geschüttelt und mit physiologischer Kochsalzlösung hundertfach verdünnt. Von dieser Verdünnungsstufe wurde jeweils 0,01 ml Bouillon mit normierten Ösen auf Mannitol-Salt-Agar-Platten (Difco) ausgestrichen und mit einem Drigalski-Spatel ausgespatelt. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Platten ausgewertet. Dabei wurde die Gesamtkoloniezahl und die Zahl der mannitpositiven Kolonien ermittelt.

Die mannitpositiven Kolonien wurden auf Blutplatten überimpft, um sie auf das Vorhandensein von β -Hämolyse (hot-cold-lysis) zu prüfen. Die nicht β -hämolytischen Kolonien wurden dann der Plasmaagglutination unterzogen. Die Plasmaagglutination wurde nach der Methode von GRÜN (1961) durchgeführt. Mannitpositive Kolonien zeigten eine gelbliche Verfärbung des Nährbodens unter den Kolonien und in der Umgebung der Kolonien. Auch wuchsen sie im allgemeinen üppiger als die auf rötlichem Untergrund wachsenden mannitnegativen Kolonien.

- b) Bei 5 Rinderherden mit 34 Kühen wurden die Wattetupfer nach dem Abstrich in 5 ml sterile Magermilch gegeben. Die Magermilch war vorher an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils für 30 Minuten im Dampftopf erhitzt und danach mit Natriumazid versetzt worden. Pro Liter Magermilch wurden 50 mg Natriumazid zugesetzt. Nach 100facher Verdünnung der kontaminierten Magermilch in physiologischer Kochsalzlösung wurden 0,01 ml dieser Verdünnungsstufe mit einer genormten Öse auf Blutplatten verbracht und danach mit Drigalski-Spatel ausgespatelt. Dieser Nährboden (nach CULLEN und HEBERT, 1967) weist folgende Zusammensetzung auf:

Aesculin	0,1 g
Rinderblut	70,0 ml
Amphotericin B	10 mg
Actidion	0,1 g
Tryptose Blood	
Agar Base	33 g
Aqua dest.	1000 ml

Die Bebrütung erfolgte bei 37°C für die Dauer von 48 Stunden. β -Hämolysinbildner wurden als koagulasepositive Staphylokokken betrachtet. Bei Kolonien mit gelbem und grauem Pigment und entsprechender Kolonieform erfolgte die Plasmaagglutination. Bei positivem Ausfall der Reaktion wurden solche Kolonien als koagulasepositive Staphylokokken angesehen.

- c) Bei 14 Betrieben mit 73 Kühen wurden die Tupferproben unmittelbar nach der Entnahme zwecks selektiver Züchtigung und Anreicherung von koagulasepositiven Staphylokokken direkt in ein selektives, flüssiges Anreicherungsmedium nach HEE-SCHEN et al. (1968) gegeben.

Das zu 5 ml abgefüllt, beimpfte Selektivmedium wurde 22 Stunden bei 37°C bebrütet. Bei Anwesenheit von koagulasepositiven Staphylokokken soll es in Abhängigkeit von der Keimeinsaat zu einer grauen bis schwarzen Verfärbung des Nährmediums infolge von Telluritspaltung kommen. Auch sehr starker Bodensatz wurde bei unverändertem Überstand als positiv gewertet.

Das Selektivmedium wurde nach intensivem Schütteln 1000-fach verdünnt. Danach wurden 0,01 ml des Mediums mit einer normierten Öse auf Blutplatten (Blood Agar Base, Oxoid) verbracht und mit Drigalski-Spatel ausgespatelt. Nach 36 - 48 Stunden Bebrütungszeit bei 37°C ist ermittelt worden, wieviel Kolonien gewachsen waren. Staphylokokken-Kolonien, die keine β -Hämolysen zeigten, wurden mittels Plasmaagglutination auf ihre Koagulasereaktion überprüft.

3. Entnahme und bakteriologische Untersuchung von Abstrichen aus dem Strichkanal

In einer Herde von 63 Kühen wurden die Strichkanäle laktierender Tiere innerhalb von zwei Monaten dreimal nach der wie folgt beschriebenen Methodik untersucht:

Es wurden Reagenzgläser verwendet, deren Zellstoffstopfen mit einem schmalen bis zum Glasboden reichenden Holzstab durchbohrt waren. Die Gläser mit den Holzstäben wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Auf das sterile am Glasboden befindliche Ende der Holzstäbe wurden unter UV-Licht Plastikzitzenkanülen aufgesteckt, die zuvor, nach der Entnahme aus steriler Verpackung, 15 Minuten in kochendem Wasser erhitzt worden waren. Die Plastikkanülen waren vor dem Erhitzen an ihrer Spitze mit einer Feile aufgeraut worden. Durch das Aufrauen sollte bei der Strichkanaluntersuchung möglichst viel von der weichen Keratinschicht an den Kanülen haften.

Nach sehr sorgfältiger Desinfektion der Zitzenkuppe mit 70% Alkohol wurden die Plastikkanülen vorsichtig ca. 4 mm in den Strichkanal eingeführt, herausgezogen und in Reagenzgläser gegeben, die jeweils 0,5 ml Nährbouillon (Nutrient Broth, Oxoid) enthielten.

Nach sofortiger Kühlung wurden innerhalb von 5 Stunden 0,01 ml Nährbouillon nach intensivem Schütteln der Reagenzgläser auf Blutplatten ausgestrichen. Nach 36 - 48 stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Platten ausgewertet.

Unmittelbar nach Entnahme der Strichkanalproben erfolgte bei den gleichen Kühen die Entnahme der Tupferproben. Daraufhin wurde die Entnahme von Viertelgemelkproben (Anfangs- und Endgemelk) durchgeführt.

C. Versuche und Versuchsergebnisse

1. Untersuchungen zum Vorkommen von *Staph. aureus* auf der Euterhaut in Milchviehherden ohne Nachweis von *Staph. aureus* in der Milch

Um sicherzugehen, daß in den ausgewählten 30 Milchviehherden zwischenzeitlich keine neuen *Staph. aureus*-Infektionen aufgetreten sind, wurden Viertelgemelkproben von sämtlichen laktierenden Kühen unmittelbar vor Versuchsbeginn nochmals bakteriologisch-kulturell und quantitativ-zytologisch untersucht. In keiner der untersuchten Proben konnte *Staph. aureus* nachgewiesen werden.

Von 62 Kühen aus 11 Herden wurde je ein Abstrich von der Zitzenkuppe, der Zitzenwand und der Euterhaut nach der unter B. 2 a) beschriebenen Methode gemacht.

Für jeden Abstrich stand eine Mannitplatte zur Verfügung. Insgesamt wurden 186 Tupferproben entnommen. Tabelle 1 gibt die Untersuchungsergebnisse wieder.

Tabelle 1: Kulturelle Untersuchung der Tupferproben von Zitzen- und Euterhaut
mittels Mannitol Salt Agar

Kuh Nr.	Anzahl der Kolonien auf Mannitol Salt Agar					
	A		B		C	
	insge- samt	davon positiv	insge- samt	davon positiv	insge- samt	davon positiv
1	32	10	160	40	92	25
2	42	7	57	12	235	34
3	17	3	17	4	20	5
4	73	15	64	16	69	9
5	5	-	102	24	72	12
6	29	4	19	2	3	-
7	78	12	113	30	27	12
8	29	5	38	4	31	9
9	12	-	37	7	21	2
10	24	6	8	-	54	17
11	104	31	73	19	42	21
12	8	1	14	2	12	2
13	221	35	112	27	69	15
14	7	2	4	1	116	20
15	212	42	73	12	46	7
16	79	12	15	2	59	9
17	25	3	18	2	13	1
18	3	1	58	11	9	-
19	159	27	172	35	204	32
20	19	5	18	2	79	25
21	83	21	61	17	33	9
22	62	12	69	14	57	10
23	800	72	750	55	33	7
24	45	12	154	27	210	35
25	195	37	105	29	157	31
26	103	17	160	18	25	9
27	37	5	39	7	42	10
28	22	9	112	22	24	5
29	56	7	55	15	27	12
30	84	21	113	26	146	29
31	69	15	84	12	96	13
32	10	1	28	2	37	5
33	28	12	41	9	125	17
34	30	5	44	9	77	15
35	7	3	420	27	500	51
36	79	19	27	7	67	18
37	4	1	24	9	75	19
38	168	44	17	5	2	-
39	121	21	103	19	324	35
40	650	62	243	42	160	24
41	115	16	246	37	152	25
42	58	12	22	7	11	5
43	37	14	32	13	130	27
44	49	19	44	10	72	21
45	52	19	22	7	34	12
46	93	25	5	-	47	11
47	58	21	57	15	12	7
48	35	11	74	21	14	2
49	37	9	15	8	8	4
50	31	12	7	2	152	24
51	9	3	16	7	120	29
52	12	2	3	-	1	-
53	23	4	18	4	6	3
54	17	4	4	2	2	2
55	8	1	3	1	12	3
56	66	21	160	37	132	31
57	73	25	66	17	98	25
58	291	63	256	51	68	21
59	101	29	88	26	31	12
60	16	5	106	31	36	19
61	80	15	108	42	104	31
62	82	21	53	27	35	35
Summe	5.170	968	5.226	988	4.767	960

Zeichenerklärung:

A = Tupferproben von der Zitzenkuppe

B = Tupferproben von der Zitzenwand

C = Tupferproben von der Euterhaut

Als Staph. aureus wurden im Rahmen dieser Untersuchungen alle Keime bezeichnet, die β -Hämolysin (hot-cold-lysis) bildeten. Alle mannitpositiven Keime, die eine negative Reaktion in der Plasmaagglutination zeigten, wurden als nicht zu Staph. aureus gehörig bezeichnet.

Insgesamt 15.163 Kolonien wurden auf ihre Mannitspaltung überprüft. 2.916 Kolonien waren mannitpositiv.

Alle 2.916 mannitpositiven Kolonien wurden auf Blutplatten überimpft, um sie auf ihre β -Hämolysininbildung zu überprüfen. Dabei zeigte keine der 2.916 mannitpositiven Kolonien β -Hämolysininbildung. Daraufhin wurden alle 2.916 Kolonien mittels Plasmaagglutination mit Kaninchenplasma geprüft. Hier zeigte ebenfalls keine der Kolonien eine positive Reaktion. Somit konnten bei Anwendung des unter B. 2 a) beschriebenen Verfahrens keine koagulasepositiven Staphylokokken an der Zitzenkuppe, der Zitzenwand und an der Euterhaut nachgewiesen werden, wenn in der Herde keine Ausscheidung von Staph. aureus mit der Milch nachgewiesen werden konnte.

Von 34 Kühen aus 5 Herden wurde je eine Tupferprobe von der Zitzenkuppe, der Zitzenwand und der Euterhaut nach der unter B 2 b) beschriebenen Methode genommen. Insgesamt wurden 102 Abstriche gemacht. Tabelle 2 gibt Aufschluß über diese Untersuchungen.

Tabelle 2: Kulturelle Untersuchung der Tupferproben von Zitzen- und Euterhaut mittels Blutagar mit selektiven Agentien (nach CULLEN und HEBERT, 1967)

Kuh Nr.	Anzahl der Kolonien auf Blutagar					
	A		B		C	
	insge- samt	davon Staph. aureus ver- dächtig	insge- samt	davon Staph. aureus ver- dächtig	insge- samt	davon Staph. aureus ver- dächtig
1	65	15	385	73	270	52
2	120	27	145	34	60	13
3	58	23	95	27	43	11
4	54	19	220	46	51	17
5	155	37	120	43	74	29
6	13	3	75	17	54	21
7	73	29	135	36	72	17
8	64	18	250	57	69	25
9	37	12	250	34	400	64
10	300	57	163	42	470	42
11	500	75	360	45	144	36
12	106	24	131	16	124	27
13	33	9	156	37	43	21
14	57	22	Rasen	-	400	51
15	112	27	370	42	260	42
16	28	14	61	23	117	27
17	43	13	27	27	94	25
18	-	0	0	0	0	0
19	35	16	79	12	63	19
20	17	5	78	26	350	64
21	Rasen	-	42	21	59	11
22	9	-	75	8	126	16
23	37	19	127	49	67	26
24	35	7	82	23	340	87
25	75	20	380	83	360	56
26	65	21	175	54	56	13
27	210	45	360	84	57	32
28	335	76	475	97	350	65
29	98	16	87	37	600	123
30	145	39	137	75	63	32
31	45	10	77	12	35	5
32	-	-	20	11	63	24
33	45	23	187	76	89	32
34	37	32	25	15	40	9
Summe	3.006	753	5.349	1.282	5.463	1.134

Zeichenerklärung:

A = Tupferproben von der Zitzenkuppe

B = Tupferproben von der Zitzenwand

C = Tupferproben von der Euterhaut

Vor diesem Versuch war das Vermögen von 20 bekannten, β -hämolyisinbildenden Staph. aureus-Stämmen auf den speziellen Blutplatten β -Hämolyisin zu bilden, getestet worden. Alle 20 Stämme zeigten eine deutliche β -Hämolyisinbildung.

Es wurden insgesamt 13.818 Kolonien überprüft. Von diesen 13.818 Kolonien gehörten 3.169 Kolonien zur Familie der Micrococcaceae. Sie wurden ausnahmslos in der Plasmaagglutination überprüft, die in allen Fällen negativ verlief.

β -Hämolyisinbildner konnten nicht festgestellt werden.

Auch nach diesem Verfahren konnten keine koagulasepositiven Staphylokokken im Bereich von Euter und Zitze nachgewiesen werden, wenn in der betreffenden Herde eine Ausscheidung von Staph. aureus über die Milch nicht erfolgte.

Von 73 Kühen aus 14 Herden wurde jeweils eine Tupferprobe von der Zitzenkuppe, der Zitzenwand und der Euterhaut genommen und nach der unter B. 2 c) beschriebenen Methode untersucht. Insgesamt wurden 219 Abstriche gemacht (Tab. 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der selektiven Anreicherung (nach Heeschen et al., 1968) und der kulturellen Untersuchung von Tupferproben von Zitzen und Euterhaut

Kuh Nr.	A		B		C	
	Ergebn. Anreicherung	Koloniezahl Blutplatte	Ergebn. Anreicherung	Koloniezahl Blutplatte	Ergebn. Anreicherung	Koloniezahl Blutplatte
1	-	1	-	0	-	0
2	-	61	1	5	-	21
3	-	24	1	45	1	22
4	3	51	3	46	2	94
5	3	41	3	43	3	15
6	2	125	3	34	2	74
7	2	102	1	94	1	25
8	2	34	1	28	1	30
9	1	25	1	35	1	26
10	1	140	2	32	1	15
11	1	29	1	50	3	12
12	1	8	1	44	1	7
13	-	21	1	18	1	85
14	1	4	1	18	2	17
15	2	124	2	97	1	16
16	1	9	2	30	1	35
17	1	20	1	12	1	13
18	1	11	1	16	-	39
19	1	52	1	114	-	30
20	1	13	-	74	1	82
21	1	45	1	108	-	24
22	1	23	-	62	1	34
23	-	1	-	9	-	10
24	1	14	1	27	1	16
25	2	22	1	34	1	21
26	1	81	2	21	1	100
27	3	18	2	35	2	30
28	1	42	2	98	1	22
29	2	61	2	90	-	102
30	2	25	1	64	2	27
31	2	16	1	8	1	15
32	5	8	1	12	-	10
33	5	13	1	13	1	9
34	5	11	1	16	1	17
35	5	35	1	10	1	1
36	5	9	1	11	1	4
37	2	26	2	4	1	31
38	2	27	2	21	-	54
39	2	110	1	205	1	250
40	2	16	2	24	1	16
41	1	14	1	15	1	44
42	2	15	1	63	1	21
43	1	19	1	10	1	58
44	1	87	1	63	1	70
45	1	110	2	36	1	85
46	1	87	3	19	3	25
47	3	1	1	11	2	2
48	2	55	1	75	2	60
49	2	11	1	55	2	9
50	1	19	2	24	3	82
51	1	14	1	13	3	14
52	2	19	1	45	2	11
53	1	22	1	9	1	4
54	2	14	2	18	2	28
55	-	2	-	2	-	0
56	1	0	1	0	1	28
57	1	23	2	2	1	1
58	1	12	1	31	1	56
59	1	35	2	3	1	17
60	2	94	1	102	-	153
61	2	35	2	84	1	23
62	1	73	1	45	1	65
63	1	143	2	19	1	78
64	1	34	2	54	1	98
65	1	41	1	71	1	88
66	1	1	1	121	1	92
67	1	9	1	0	-	0
68	1	12	2	28	1	54
69	1	23	-	1	1	12
70	1	21	1	76	1	24
71	1	24	1	25	1	21
72	1	25	1	27	2	24
73	1	43	1	57	1	36
		2.635		2.911		2.834

Zeichenerklärung: A = Tupferproben von der Zitzenkuppe; B = Tupferproben von der Zitzenwand;
C = Tupferproben von der Euterhaut

(Ergebnisse Anreicherung)

3 = sehr starker Bodensatz oder Verfärbung des Mediums

2 = mittelgradiger Bodensatz

1 = geringer Bodensatz

- = kein Bodensatz und keine Verfärbung

An die selektive Anreicherung nach HEESCHEN et al. (1968) schloß sich eine bakteriologisch-kulturelle Untersuchung an.

Insgesamt wurden 8.466 Kolonien überprüft, von denen 3.996 der Familie Micrococcaceae zugerechnet wurden. Diese 3.996 Kolonien wurden in der Plasmaagglutination mit Kaninchenplasma überprüft. Die Reaktionen waren ausnahmslos negativ. β -Hämolysinbildner konnten nicht ermittelt werden. Koagulasepositive Staphylokokken konnten aus den Tupferproben von Zitzenkuppe, Zitzenwand, sowie Euterhaut nicht isoliert werden.

2. Untersuchungen zum Vorkommen von Staph. aureus im Strichkanal und auf der Euterhaut bei gleichzeitigem Nachweis von Staph. aureus in der Milch einzelner Kühe in der Herde

Eine Herde mit 63 Kühen wurde jeweils im Abstand von zwei Monaten dreimal untersucht. Bei der dritten Untersuchung konnten nur 60 Kühe erfaßt werden, da drei Kühe in der Zwischenzeit trocken-gestellt wurden.

Im Verlauf jeder Untersuchung wurde pro Kuh je eine Probe aus den vier Strichkanälen und aus dem Anfangs- und Endgemelk der vier Euterviertel sowie zwei Proben von der Euterhaut genommen.

Die Untersuchung der Strichkanal-Abstriche erfolgte nach der unter B. 3 aufgeführten Methodik, die der Anfangs- und Endgemelkproben nach dem unter B. 1 beschriebenen Verfahren und die der Tupferproben von der Euterhaut nach der unter B. 2 a) und b) fixierten Methode.

Es wurden insgesamt 744 Strichkanal-Abstriche, 744 Viertelgemelkproben vom Anfangsgemelk, 744 Viertelgemelksproben vom Endgemelk und 372 Abstriche von der Euterhaut untersucht (Tab. 4, 5 und 6).

Tabelle 4: Vorkommen von Staph. aureus auf der Euterhaut, im Strichkanal, sowie im Anfangs- und Endgemelk nach wiederholter Untersuchung laktierender Kühe in einer Herde

Anzahl der Un- tersu- chungen ^{†)} v. Kühen	Nachweis von Staph. aureus				
		Euter- haut	Strich- kanal	Anfangs- gemelk	End- gemelk
40	21,5%	+	+	+	+
10	5,4%	+	+	+	-
22	11,8%	-	+	+	+
6	3,2%	+	+	-	-
10	5,4%	-	+	+	-
15	8,0%	+	-	-	-
17	9,1%	-	+	-	-
66	35,5%	-	-	-	-

Σ 186

^{†)} dreimalige Untersuchung von 60 und
zweimalige Untersuchung von 3 Kühen

Tabelle 5: Staph. aureus-Infektionen des Strichkanals und Nachweis dieser Keime im Anfangs- und Endgemelk

Staph. aureus- Infektionen des Strichkanals	Staph. aureus-Befund im	
	Anfangsgemelk	Endgemelk
106 (= 40, 3%)	+	+
54 (= 20, 5%)	+	-
103 (= 39, 2%)	-	-

Σ 263

Tabelle 6: Eingruppierung der Staph. aureus-Befunde nach der Anzahl der in den Strichkanal-Abstrichen nachgewiesenen koagulasepositiven Staphylokokken

Anzahl der im Strichkanal nachgewiesenen koagulasepositiven Staphylokokken ⁺⁾	Anzahl der Strichkanal-abstriche	Staph. aureus-Befunde (in %) im	
		Anfangs-melk	Endge-melk
50 - 250	47	55,3	34,0
251 - 1.000	57	33,3	24,6
1.001 - 2.000	25	68,0	40,0
2.001 - 4.000	36	75,0	50,0
4.001 -10.000	55	74,6	50,9
über 10.000	43	69,8	46,5

Summe

Σ 263

⁺⁾ 50 Kolonien = untere Nachweisgrenze der angewandten Methode

IV. DISKUSSION

Die zum Nachweis von koagulasepositiven Staphylokokken auf der Euter- und Zitzenhaut im Rahmen der eigenen Untersuchungen angewendeten Verfahren müssen als sehr geeignet bezeichnet werden. In der Literatur wird der bei den eigenen Untersuchungen verwendete Mannitol Salt Agar günstig beurteilt (GRÜN, 1961). Er wird in den verschiedenen Laboratorien häufig zur Züchtung dieser Keime aus mikrobiell kontaminierten Material verwendet. Seine Eignung wurde erst unlängst durch eine englische Arbeitsgruppe (Public Health Laboratory Service Working Party, 1972) bestätigt, die nach einer von 7 Laboratorien durchgeführten Vergleichsuntersuchung von Lebensmittelproben dieses Selektivmedium (und zwei andere) von insgesamt 11 getesteten Medien als das am besten geeignete herausstellte. Mannitpositive Kolonien waren auf Mannitol Salt Agar bei den eigenen Untersuchungen gut zu erkennen. Sie wurden ausnahmslos als "Staphylococcus aureus-verdächtig" angesehen. Durch die anschließende Testung auf das Vorhandensein von β -Hämolysin (hot-cold-lysis) und durch die Plasmaagglutination der auf Blutagar gewachsenen Kulturen wurden koagulasepositive Staphylokokken mit großer Sicherheit herausgefunden. β -Hämolysinbildner sind fast ausnahmslos koagulasepositive Staphylokokken (SCHALM und WOODS, 1953; GEDEK, 1966). Nach SCHALM und WOODS waren unter 2.084 β -Hämolysinbildnern 2.065 Staphylokokkenstämme. Die beim Rind vorkommenden Staphylokokken sind zu einem hohen Prozentsatz β -Hämolysinbildner (ELEK und LEVY, 1950; LOKEN und HOYT, 1962; SCHALM und WOODS, 1953). Als taxonomisches Merkmal für *Staph. aureus* gilt die positive Koagulasereaktion. Die Ergebnisse der Koagulasereaktion stimmen mit der Plasmaagglutination gut überein. Die in der Literatur angegebene Quote der Übereinstimmung schwankt zwischen 99 und 88% (GRÜN, 1961).

Die zweite angewendete Methode hatte sich bereits bei den epidemiologischen Untersuchungen von CULLEN und HEBERT (1967), FORBES und HEBERT (1968), sowie FORBES (1968, 1970a, 1970b) bewährt. Der feste Nährboden enthält keine gegen Bakterien gerichteten Hemmstoffe und erlaubt deswegen eine besonders sichere Erfassung von

koagulasepositiven Staphylokokken, die auf Blutagar üppig wachsen. Bei Zusatz von selektiven Agentien muß mit einer gewissen Hemmwirkung auch auf die Keime gerechnet werden, die eigentlich mit dem betreffenden Medium nachgewiesen werden sollen. Zusätzlich wurde bei den eigenen Untersuchungen der sterilen Magermilch Natriumazid im Verhältnis 1 : 20.000 zugesetzt. Natriumazid in der gleichen Konzentration wurde von SLANETZ und BARTLEY (1953) zur Züchtung von Staphylokokken aus der Milch mit Erfolg verwendet.

Um auch vereinzelt an der Euter- und Zitzenhaut befindliche koagulasepositive Staphylokokken zu erfassen, wurde auch ein selektives Auswertungsverfahren angewendet, das an sich für die Untersuchung von Milchproben empfohlen wird. Da bei Tupferabstrichen mit einer stärkeren mikrobiellen Kontamination zu rechnen ist als bei Milchproben aus dem Euter, wurde unabhängig vom Reaktionsausfall der Probe ein Ausstrich auf Blutagar gemacht und die gewachsenen Kolonien auf ihre Zugehörigkeit zu *Staph. aureus* geprüft. Koagulasepositive Staphylokokken im Untersuchungsgut würden mit dieser Methode mit Sicherheit erfaßt werden.

Mit keiner der angewendeten Methoden konnten koagulasepositive Staphylokokken aus Abstrichen der Euter- und Zitzenhaut von solchen Kühen isoliert werden, die in Herden standen, die als frei von *Staph. aureus*-Infektionen ermittelt worden waren. Die Euter- und Zitzenhaut ist bei gleichzeitigem Vorhandensein von *Staph. aureus*-Euterinfektionen naturgemäß ein häufiger Fundort von koagulasepositiven Staphylokokken (SPENCER und LASMANIS 1952; EDWARDS und RIPPON 1957; DAVIDSON 1961, a, b).

Diese Befunde wurden durch die eigenen Untersuchungen in vollem Umfange bestätigt. Nun ist bekannt, daß koagulasenegative Micrococcaceae die dominierenden Keime der Euter- und Zitzenhautflora beim Rind darstellen (CULLEN und HEBERT, 1967). Bei koagulasepositiven Micrococcaceae wurden diesbezüglich sehr unterschiedliche Befunde erhoben, so daß geprüft werden muß, ob diese Keime überhaupt zur normalen Euterhautflora gehören. Bisher wurde der fehlende Nachweis des *Staph. aureus* von der Euterhaut oder von anderen

Körperstellen nicht in Beziehung zu *Staph. aureus*-Euterinfektionen in der einzelnen Herde gebracht (ROUNTREE et al., 1956; ORTEL, 1965; PULVERER und ENTEL, 1967). KIELWEIN (1966) fand Hämotoxin-bildende Staphylokokken nur auf der Haut von Kühen, die Euterinfektionen mit solchen Keimen aufwiesen, oder die direkt neben diesen Kühen aufgestellt waren. Neben diesem Hinweis, daß *Staph. aureus* unter Umständen nicht zur normalen Euterhautflora gehört, sind die Untersuchungen von DAVIDSON (1961) von Bedeutung, der in einer Herde von Färsen, die von einer Milchviehherde mit *Staph. aureus*-Euterinfektionen getrennt gehalten wurden, weder im Euter noch auf der Euterhaut koagulasepositive Staphylokokken fand. Die eigenen Untersuchungen an 30 Milchviehherden ergaben, daß *Staph. aureus* nicht zur normalen Euterhautflora gehört. Weitere Untersuchungen der Keimflora um Haut- und Körperöffnungen vom Rind müssen klären, ob *Staph. aureus* beim Rind als ubiquitärer Keim anzusehen ist oder nicht.

Aus den eigenen Untersuchungen geht weiter hervor, daß *Staph. aureus*-Strichkanalinfektionen in einem beachtlich hohen Prozentsatz nicht mit einem positiven Nachweis in der aseptisch entnommenen Milch verbunden sind (Tab. 5). Für das Endgemelk war der entsprechende Prozentsatz mit 59,7 erwartungsgemäß höher als für das Anfangsgemelk mit 39,2, da der sekretorische Keimgehalt der Milch vom Anfangs- zum Endgemelk hin bekanntlich deutlich abnimmt. Selbst bei hoher Keimzahl im Strichkanal (mehr als 4.000 nachgewiesene koagulasepositive Staphylokokken) wurde im entsprechenden Anfangsgemelk nur in 69,8 bis 75,0% der Fälle ein positiver *Staph. aureus*-Befund erstellt (Tab. 6). Die Anzahl der Strichkanalinfektionen und die Anzahl der koagulasepositiven Staphylokokken im Strichkanal dürfte noch höher liegen als bei den eigenen Untersuchungen nachgewiesen, da der Strichkanal 5 bis 14 mm lang ist (HEIDRICH und RENK, 1963), mit der hier verwendeten Spezialkanüle aber nur 4 mm eingegangen wurde, um nicht in die Zitzenzisterne einzudringen. Die Ergebnisse zeigen, daß positive *Staph. aureus*-Befunde in den Anfangsgemelkproben sehr häufig mit solchen in den Strichkanal-Abstrichen verbunden sein können. Nur eine Punktion der Zitzen- oder Drüsenzisterne

kann letztlich klären, ob intramammäre Infektionen vorliegen. Die Technik der Zisternenpunktion wurde von MURPHY und STUART (1954) und von HEIDRICH et al. (1964 a, b) beschrieben und ist als praxisreif zu bezeichnen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im ersten Teil der hier vorgelegten Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob und in welchem Umfange gegebenenfalls koagulasepositive Staphylokokken auf der Euter- und Zitzenhaut beim Rind vorkommen, wenn durch vorhergehende wiederholte Untersuchungen aseptisch entnommener Milchproben die entsprechende Herde als frei von *Staph. aureus*-Euterinfektionen ermittelt worden war. 30 Herden mit insgesamt 169 Kühen wurden in die Untersuchungen einbezogen.
2. Die Tupferabstriche von der Haut des Euters und der Zitzen wurden nach drei verschiedenen Verfahren, einschließlich einer selektiven Anreicherungs-methode, untersucht. In keiner der insgesamt 507 Proben konnte *Staph. aureus* nachgewiesen werden. Koagulasenegative Micrococcaceae wurden dagegen häufig nachgewiesen. Der Anteil der mannitpositiven unter den Micrococcaceae-Kolonien auf Mannitol Salt Agar betrug 19,2%. Insgesamt wurden 37.361 Kolonien auf ihre Zugehörigkeit zu *Staph. aureus* geprüft. Die Untersuchungen haben ergeben, daß *Staph. aureus* nicht zur normalen Keimflora der Euter- und Zitzenhaut beim Rind gehört.
3. Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde geprüft, welche Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen von *Staph. aureus* im Strichkanal, in aseptisch entnommenen Viertelgemelkproben (Anfangs- und Endgemelk), sowie auf der Euter- und Zitzenhaut bestehen. 63 Kühe in einer Herde mit gehäuftem Auftreten von *Staph. aureus*-Euterinfektionen wurden zu diesem Zweck wiederholt untersucht.
4. *Staph. aureus*-Strichkanalinfektionen waren in 39,2% und in 59,7% der Fälle nicht mit einem entsprechenden positiven Befund im Anfangs- bzw. Endgemelk verbunden.

VI. SUMMARY

1. The first question of the investigations was whether coagulase positive staphylococci are to be found on the skin of the udder and the teats of cows which were declared to be free of staphylococcal mastitis. These examinations were made in 30 herds with 169 cows.
2. The smears of the skin of the udder and teats were examined in three different ways inclusive a selective method of concentration. In none of 507 samples *S. aureus* could be found. The share of mannitol positive micrococci within the micrococcal colonies on Mannitol Salt Agar was 19,2 per cent. Altogether 37.361 colonies were examined to their belonging to *S. aureus*. These examinations showed that *S. aureus* is not classed with the normal microbial content of udder and teats of cattle.
3. The second question was, if there is a connexion between *S. aureus* from the streak canal, from quarter milk samples which had been taken aseptical, from the skin of udder and teats. 63 cows with staphylococcal mastitis were examined several times.
4. 39,2 per cent of *S. aureus* infections of the streak canal did not occur with the same positive result in foremilk, respectively 59,7 per cent with the positive result in strippings milk.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) BAIRD-PARKER, A.C.
An improved diagnostic and selective medium for
isolating coagulase positive staphylococci.
J. appl. Bact. 25, 12-19 (1962)
- 2) BAIRD-PARKER, A.C.
A classification of micrococci and staphylococci
based on physiological and biochemical tests.
J. gen. Microbiol. 30, 409-427 (1963)
- 3) BEECH, J.A. und FORBES, D.
Pathogens in the streak canal.
Vet. Rec. 77, 1085-1086 (1965)
- 4) BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. and SMITH, N.R.
Bergeys manual of determinative bacteriology.
The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1957
- 5) CULLEN, G.A. und HEBERT, C.N.
Some ecological observations on micro-organisms
inhabiting bovine skin, teat canals and milk.
Br.vet. J. 123, 14-25 (1967)
- 6) DAVIDSON, J.
Observations on the pathogenic staphylococci in a
dairy herd during a period of six years.
Res.vet.Sci. 2, 22-40 (1961a)
- 7) DAVIDSON, J.
The epidemiology of staphylococcal mastitis
Vet.Rec. 73, 1015-1019 (1961b)
- 8) DIERNHOFER, K.
Diagnostik der Euterentzündungen.
Wien. Tierärztl. Mschr. 37, 809-866 (1950)
- 9) EDWARDS, S.J. und RIPPON, J.E.
The characters and distribution of certain staphylo-
cocci pathogenic for the bovine udder.
J. com.Path. 67, 111-125 (1957)
- 10) ELEK, S.D. und LEVY, E.
Distribution of haemolysins in pathogenic and
non-pathogenic staphylococci.
J. Path. Bact. 62, 541-554 (1950)
- 11) EVANS, J.B.
Studies of staphylococci with special reference to
the coagulase-positive types.
J.Bact. 55, 793-800 (1948)

- 12) FORBES, D.
The passage of staphylococci through the bovine teat canal.
J.Dairy Res. 35, 399-406 (1968)
- 13) FORBES, D.
The pathogenesis of bovine mastitis.
Vet.Bull. 39, 529-541 (1969)
- 14) FORBES, D.
The pathogenic significance of various intramammary infections.
Br.vet.J. 126 (5) 260-267 (1970)
- 15) FORBES, D. und HEBERT, C.N.
Studies in the pathogenesis of staphylococcal mastitis.
Vet.Rec. 82, 69-73 (1968)
- 16) GEDEK, W.
Zur Routinediagnostik in Milch vorkommender Staphylokokken und Mikrokokken.
Arch.Lebensmittelhyg. 17, 110-113 (1966)
- 17) GRÜN, L.
Die biochemischen Eigenschaften der Staphylokokken im Hinblick auf Pathogenitätsbestimmung und Differenzierung der Keime zur Erkennung des Staphylokokken-Hospitalismus.
Forschungsber.des Landes Nordrhein-Westfalen Nr.1049.
Westdeutscher Verlag, Köln und Opladen 1961
- 18) GRÜN, L.
Staphylokokken in Klinik und Praxis.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
Stuttgart 1964
- 19) HEESCHEN, W., TOLLE, A. und ZEIDLER, H.
Die selektive Züchtung und Anreicherung koagulase-positiver Staphylokokken und euterpathogener Streptokokken in flüssigen Nährmedien.
Arch.Lebensmittelhyg. 19, 184-189 (1968)
- 20) HEIDRICH, H.J., GROSSKLAUS, D. und MÜLLING, M.
Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an durch Handmelken und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchen. I. Untersuchungen an Venülenmilchen.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 77, 83-84 (1964a)
- 21) HEIDRICH, H.J., MÜLLING, M. und BIRKNER, H.W.
Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an durch Handmelken und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchen. II. Vergleichende Untersuchungen an Handmelk- und Venülenmilchen.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 77, 85-87 (1964b)

- 22) HEIDRICH, H.J. und RENK, W.
Die Krankheiten der Milchdrüse bei Haustieren.
1. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und München(1963)
- 23) HILL, L.R.
The Adansonian classification of the staphylococci.
J. gen. Microbiol. 20, 277-283 (1959)
- 24) KIELWEIN, G.
Beobachtungen in Vorzugsmilchbetrieben mit Staphylokokkeninfektionen.
Tierärztl. Umschau 21, 343 (1966)
- 25) LOKEN, K.J. und HOYT, H.H.
Studies on bovine staphylococcic mastitis.
I. Characterization of staphylococci.
Am.J.vet.Res. 23, 534-540 (1962)
- 26) MCDIARMID, A.
The carriage of *Staphylococcus aureus* in the milk and on the teats of normal cows.
Vet.Rec 59, 11-12 (1947)
- 27) MURPHY, J.M. und STUART, O.M.
The syringe collection of milk via teat-wall puncture as an aid in the study of artificial infection of the bovine mammary gland.
Cornell Vet. 44, 501-511 (1954)
- 28) ORTEL, S.
Zur Lysotypie von *Staphylococcus aureus*-Stämmen aus Nasen- und Rachenabstrichen von Tieren.
5.Colloquium über Fragen der Lysotypie in Wernigerode (Harz), Tagungsbericht S. 171-174 (1965)
- 29) PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE WORKING PARTY, UK
A comparative assessment of media for the isolation and enumeration of coagulase positive staphylococci from foods.
J.appl.Bact. 35, 673-679 (1972)
- 30) PULVERER, G. und ENTEL, H.J.
Physiologisches Vorkommen koagulasepositiver Staphylokokken im Tierreich. I. Nachweis koagulasepositiver Staphylokokken im Nasenrachenraum von Haustieren und wildlebenden Tieren.
Zbl.Bakt. I Orig. 202, 344-351 (1967)
- 31) ROUNTREE, P.M., FREEMAN, B.M. und JOHNSTON, K.G.
Nasal carriage of *staphylococcus aureus* by various domestic and laboratory animals.
J. Path. Bact. 72, 319-321 (1956)

- 32) SHARPE, M.E., NEAVE, F.K. and REITER, B.
Staphylococci and micrococci associated with dairying.
J.appl.Bact. 25, 403-415 (1962)
- 33) SHAW, C., STITT, J.M. and COWAN, S.T.
Staphylococci and their classification.
J.gen.Microbiol. 5, 1010-1022 (1951)
- 34) SLANETZ, L.W. and BARTLEY C.H.
The diagnosis of staphylococcal mastitis, with
special reference to the characteristics of mastitis
staphylococci.
J.inf.Dis. 92, 139-151 (1953)
- 35) SPENCER, G.R. und LASMANIS, J.
Reservoirs of infection of Micrococcus pyogenes in
bovine mastitis.
Am.J.vet.Res. 13, 500-503 (1952)
- 36) SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI
AND MICROCOCCI
Recommendations.
Int.Bull.best.Nomencl. 15, 109-110 (1965)
- 37) SCHALM, O.W.
Ein neuer Mastitis-Test.
Tierärztl. Umschau 15, 151-153 (1960)
- 38) SCHALM, O.W. and NOORLANDER, D.O.
Experiments and observations leading to development
of the California mastitis test.
J.Am.vet.med.Ass. 130, 199 (1957)
- 39) SCHALM, O.W. und WOODS, G.M.
Micrococcus pyogenes in bovine milk. I. Identification.
Am.J.vet.Res. 14, 530-533 (1953)
- 40) THÖRNE, H. und WALLMARK, G.
Studies on staphylococcal mastitis in an individual
herd with special reference to phage-types of iso-
lated staphylococci.
Acta vet.scand. 1, 114-120 (1960)

LEBENS LAUF

Am 6. März 1945 wurde ich, Sepp Thüring, als einziger Sohn des Tierarztes Rudolf Thüring und dessen Ehefrau Ita-Luise, geb. Klapdor, in Marktrechwitz geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit in Pfarrkirchen besuchte ich die dortige Oberrealschule, wo ich im Juli 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München und bestand im November 1969 die tierärztliche Prüfung.

Im März 1970 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Seit 1972 bin ich als selbständiger Tierarzt in Pfarrkirchen tätig.



